

**DIE BINDUNG VON PHARMAKA
AN MENSCHLICHES MUSKELGEWEBE**

Burckhard Fichtl

1974

Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität München
Direktor: Prof. Dr. Manfred Kiese

DIE BINDUNG VON PHARMAKA AN MENSCHLICHES MUSKELGEWEBE



Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
verfaßt und einer Hohen Medizinischen Fakultät
der Ludwig Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Bureckhard Fichtl
aus München

München 1974



Mit Genehmigung der medizinischen Fakultät der Universität
München

Berichterstatter: Prof. Dr. H. Kurz
Mitberichterstatter: Prof. Dr. M. Kiese
Dekan: Prof. Dr. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 21.5.1974

Inhaltsverzeichnis

I) EINLEITUNG.....	S. 1
II) METHODIK.....	S. 5
1. Herstellung des Muskelhomogenates.....	S. 5
2. Ultrafiltration.....	S. 6
3. Substanzen und Nachweismethoden.....	S. 6
4. Berechnung des gebundenen Anteils.....	S. 9
III) ERGEBNISSE.....	S. 10
IV) DISKUSSION.....	S. 16
A) Kritik der Methode	
1. Herstellung des Muskelhomogenates.....	S. 16
2. Ultrafiltration.....	S. 16
3. Berechnung des gebundenen Anteils.....	S. 21
4. Abhängigkeit der Bindung von der Homogenatkonzentration.....	S. 21
5. Bestimmung der Bindung an homogenisiertem Muskel.....	S. 23
B) Besprechung der Ergebnisse	
1. Bindung an Muskelhomogenat.....	S. 24
2. Individuelle Unterschiede der Muskelbindung....	S. 24
3. Vergleich der Bindung an Muskel, Plasma und Hämoglobin.....	S. 25
4. Zusammenhang zwischen der Bindung an Muskelgewebe und an Plasma bzw. Hämoglobin.....	S. 25
5. Abhängigkeit der Muskelbindung vom Ionisationsgrad der Substanzen.....	S. 28
6. Beziehung zwischen der Muskelbindung und der Lipidlöslichkeit der Substanzen.....	S. 29

7. Zusammenhang von Muskelbindung und den in verschiedenen Lipidphasen gemessenen Verteilungskoeffizienten.....	S.34
8. Bedeutung der ermittelten Werte.....	S.37
V) ZUSAMMENFASSUNG.....	S.38
VI) LITERATURVERZEICHNIS.....	S.39

I. EINLEITUNG

Viele Pharmaka werden im Organismus reversibel an Makromoleküle (z.B. Plasma- und Gewebsproteine, Nukleinsäuren, Polysaccharide) gebunden (Ehrenpreis 1970). Dadurch werden Wirkung, Verteilung und Elimination der gebundenen Substanzen beeinflusst (Krüger-Thiemer et al. 1964 a; Thorp 1964; Martin 1965; Brodie 1966; Keen 1971). Die meisten Arbeiten über die Bindung von Pharmaka behandeln die Plasma- bzw. Albuminbindung (Übersichten bei Goldstein 1949; Meyer u. Gutman 1968). Eine Bindung kann aber auch in den übrigen Geweben des Körpers erfolgen (Brodie 1964; Witzgall u. Boyens 1964). Da das Plasma nur einen geringen Teil (rund 5%) der Körpermasse ausmacht, wird eine Bindung im Gewebe einen größeren Einfluß haben als im Plasma (Schach v. Wittenau u. Delahunt 1966). Martin (1965) berechnete für ein vereinfachtes Körpermodell, daß von der Gesamtdosis einer Substanz, die im Plasma zu 83% gebunden wird, immerhin drei Viertel ungebunden sind. Dabei war angenommen worden, daß im Gewebe keine Bindung erfolgt. Berechnet man für Martins Modell den umgekehrten Fall (83% Gewebsbindung, keine Plasmabindung), so ergibt sich, daß nur noch rund ein Viertel der Gesamtmenge ungebunden ist.

Zur weiteren Verdeutlichung des Einflusses von Gewebs- und Plasmabindung mag folgende Überlegung dienen:

Sieht man von p_H -abhängiger Verteilung von Elektrolyten und sogenannten aktiven Transportprozessen ab, so ist die Konzentration des nicht gebundenen Anteils einer Substanz (c_f) im Verteilungsgleichgewicht in allen für die Substanz zugänglichen Geweben und Körperflüssigkeiten gleich (Dettli 1961; Scholtan u. Schmid 1962; Firemark et al. 1963).

Die Kenntnis der Größe von c_f ist deshalb von großer Bedeutung, weil in der Regel nur der freie Anteil der Pharmaka wirksam ist. Beispiele hierfür sind Cumarinderivate, Steroidhormone, Salicylate, Sulfonamide, Penicilline und andere Antibiotika (Lit. bei Ehrenpreis 1970; Keen 1971; vgl. auch Kriegelstein 1969). Von c_f abhängig ist auch die Filtration in der Niere und u.U. die Geschwindigkeit der Biotransformation eines Pharmakons (Wiseman u. Nelson 1964) (wobei aber auch die Michaeliskonstante der betreffenden Enzyme eine Rolle spielt (Keen 1971)).

In Abb.1 ist dargestellt, wie die Konzentration des nicht gebundenen Anteils einer Substanz im Körperwasser (c_f) von der Plasma- und Gewebsbindung beeinflusst wird (verändert nach Curry 1970b). Man erkennt:

- 1) Die Größe von c_f wird weitgehend durch die Gewebsbindung bestimmt. Auch bei niedriger Gewebsbindung ist c_f wenig abhängig von der Größe der Plasmabindung. Änderungen der Plasmabindung werden durch die Gewebe "gepuffert". Entsprechend fand Kunin (1966 b), daß der Effekt von Substanzen, die Penicilline aus der Plasmabindung verdrängen, in vivo geringer ist als in vitro.
- 2) Änderungen des Ausmaßes der Bindung (z.B. durch p_H -Verschiebungen, Verdrängung durch eine zweite Substanz, individuelle Unterschiede der Bindung) müssen am Gewebe einen größeren Einfluß haben als am Plasma. Nehmen wir als Beispiel eine Substanz, die im Gewebe und Plasma jeweils zu 75 % gebunden wird (Punkt A in Abb. 1). Sinkt die Plasmabindung, z.B. durch Verdrängung, auf 50 %, so ändert sich die Konzentration an ungebundener Substanz im Körperwasser nur unwesentlich (A nach B). Sinkt hingegen die Gewebsbindung auf 50 %, so steigt c_f erheblich an (A nach C in Abb. 1).

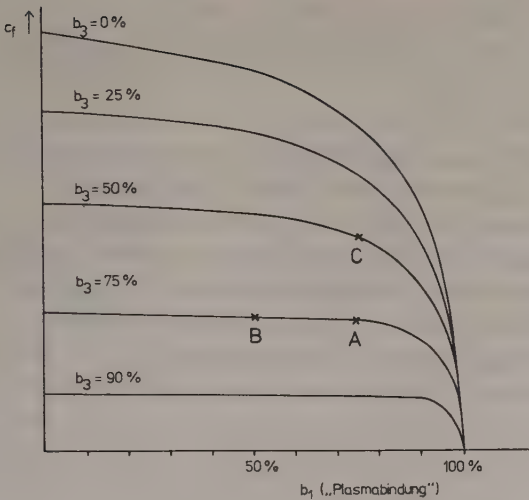


Abbildung 1: Beziehung zwischen der Konzentration an ungebundener Substanz (c_f) und der Gewebs- und Plasmapbindung. Die Kurven wurden für ein "Körper"-Modell berechnet mit den Kompartments: 1) "intravasal", Volumen 5l; Bindung b_1 (%). 2) "interstitiell", Volumen 15l; keine Bindung. 3) "Gewebe", Volumen 40l; Bindung b_3 (%).

Das obige Modell ist stark vereinfacht und setzt einen Gleichgewichtszustand voraus. Doch wird deutlich, daß der Einfluß der Gewebsbindung auf die Konzentration einer Substanz im Körperwasser erheblich größer sein muß als der der Plasmapbindung. Dennoch sind Mitteilungen über die Gewebsbindung von Pharmaka in der Literatur spärlich vertreten. Insbesondere sind vergleichende Bestimmungen der Bindung mehrerer Substanzen selten. Als Beispiele seien folgende Arbeiten erwähnt: Für die Bindung an

Hämoglobin die Arbeit von Hilzenbecher (1972; 27 Substanzen); für die Bindung an Gehirngewebe: Berti u. Ferrari (1958; 16 Phenothiazine) und Hess et al. (1968; 5 Xanthinderivate); für die Muskelbindung: Kurz (1966; 6 Kurznarkotika) und die Arbeit von Goldbaum u. Smith (1954) über die Bindung von 5 Barbituraten an Muskel und andere Gewebe.

Vergegenwärtigt man sich, daß der Anteil der Skelettmuskulatur am Körpergewicht rund 40% ausmacht, so wird klar, wie wichtig Daten über die Bindung von Pharmaka an Muskelgewebe sind. Aufgabe der vorliegenden Arbeit war es daher, an einer Reihe von Substanzen zu untersuchen, ob und in welchem Ausmaß sie an Muskelgewebe gebunden werden. Dabei erschien es notwendig, die Messungen an menschlichem Muskel vorzunehmen, da an tierischen Geweben gewonnene Daten nicht auf den Menschen übertragbar sind. Bei der Plasmabindung sind z.T. erhebliche Speziesunterschiede bekannt (Friemel 1968; Scholtan 1961; Schach v. Wittenau u. Yeary 1963). Man kann daher erwarten, daß auch bei der Muskelbindung artspezifische Unterschiede auftreten. Diese Annahme wird gestützt durch die Ergebnisse von Burns et al. (1953) über die Verteilung von Phenylbutazon in Geweben. Man kann daraus die Muskelbindung beim Menschen auf etwa 96% und beim Hund auf rund 81% schätzen.

II. METHODIK

Herstellung des Muskelhomogenates

Als Ausgangsmaterial diente Musculus psoas von Erwachsenen, der von Obduktionen von Unfalltoten stammte. Die Muskeln wurden mehrmals mit isotoner Kqchsalzlösung abgespült und mit Filtrierpapier getrocknet. Anhaftendes Fett und Bindegewebe wurden so weit als möglich wegpräpariert. Dann wurde das Material durch eine Lochplatte gepreßt und anschließend homogenisiert¹⁾. Dabei wurde darauf geachtet, den Homogenisator immer nur kurzzeitig laufen zu lassen, um eine Überhitzung des Muskelbreis zu vermeiden. Diese Arbeiten wurden im Kühlraum (+2°C) ausgeführt.

Der p_H -Wert des so hergestellten Homogenates lag, bedingt durch die postmortal ablaufende anaerobe Glykolyse, bei 5.8. Vorversuche zeigten, daß das Ausmaß der Muskelgewebsbindung vom p_H -Wert des Homogenates abhängt. Daher wurde die Wasserstoffionenkonzentration im Muskelbrei mit einer 2m Na_2CO_3 -Lösung einheitlich auf p_H 7.0 eingestellt. Dieser Wert entspricht dem intrazellulären p_H des Muskels in vivo (Bittar 1964; Waddell u. Bates 1969). Durchschnittlich wurden dafür 3 ml Lösung pro 100 g Muskelbrei benötigt. Daraus errechnet sich eine Pufferkapazität von rund 6 mval/100 g und p_H -Einheit. Das entspricht den Befunden von Bate-Smith (1938), der für eine Reihe von Säugermuskeln Werte von 4.9 - 6.3 fand.

Der Muskelbrei wurde dann durch Zugabe von 0,05 m Phosphatpuffer jeweils auf eine einheitliche Konzentration von 95% (Anteil Muskel im Homogenat) gebracht.

Zur Bestimmung des Wassergehaltes wurden Proben des Muskelbreis bei 105°C bis zur Gewichtskonstanz getrocknet.

1) "Tornado", Firma Emmendinger Maschinenbau

Ultrafiltration

Die Bestimmung des nicht gebundenen Anteils der Substanzen erfolgte durch Ultrafiltration. Dazu wurde aus "Visking"-Dialysierschläuchen¹⁾ durch Verknoten an einem Ende ein Säckchen gebildet, in das 10 g Homogenat bzw. 10 ml Puffer eingefüllt wurden. Dann wurde es durch einen zweiten Knoten verschlossen. Diese Säckchen kamen in Siebeinsätze, die in entsprechende Zentrifugengläser gesteckt wurden (Abb.2). Das ganze System wurde mit einem Deckel und Parafilm verschlossen. Dann wurde es einer gekühlten Zentrifuge (2 - 4° C) bei rund 270.g knapp 1 ml Flüssigkeit abfiltriert.

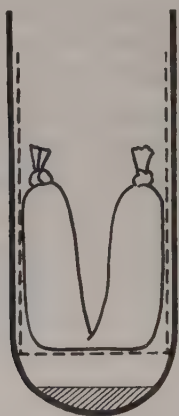


Abb.2 Vorrichtung zur
Ultrafiltration

Substanzen und Nachweismethoden

Die Substanzen, deren Muskelbindung bestimmt wurde, sind in Tab.1 aufgeführt. Um vergleichbare Ergebnisse zu erhalten, wurden die Substanzen so zugesetzt, daß die Endkonzentration im Ansatz jeweils $2 \cdot 10^{-4}$ war. Für einige Substanzen (z.B. Barbiturate, Sulfonamide) entspricht dies der Größenordnung der therapeutischen Konzentrationen, für andere Pharmaka (z.B. Desipramin, Diphenylhydantoin) liegen diese erheblich niedriger.

¹⁾ Typ 20/32, bezogen durch Serva-Feinbiochemica, Heidelberg

Substanz	Molekulargewicht	pK _a
a) Säuren		
Barbital	184	7.8
Diphenylhydantoin	252	9.2
Hexobarbital	236	8.2
Methohexital	262	8.3
Nitrofurantoin	238	7.2
Oxiphenbutazon	342	4.7
Phenobarbital	232	7.2
Phenylbutazon	308	4.5
Salicylsäure	138	3.0
Sulfadimethoxin	310	5.9
Sulfaguanidin	214	10.5
Sulfamethoxydiazin	280	6.65
Thiamylal	270	7.34
Thiobutabarbital	228	7.4
Thiopental	242	7.45
b) Basen		
Aminophenazon	231	5.0
Anilin	93	4.6
Chinin	324	8.4
Chlordiazepoxid	300	4.3
Desipramin	266	10.2
Morphin	285	8.2
Promethazin	284	9.0

Tabelle 1: Zusammenstellung der untersuchten Substanzen
mit Molekulargewicht und pK_a-Wert

Die Konzentration der Substanzen im Ultrafiltrat wurde photometrisch bestimmt. Dabei wurden folgende Nachweismethoden verwendet:

THIAMYLAL, THIOPENTAL, THIOBUTABARBITAL und METHOHEXITAL nach der Methode von Brodie et al. (1950);

BARBITAL, HEXOBARBITAL, PHENOBARBITAL nach Goldbaum (1948);

OXIPHENBUTAZON, PHENYLBUTAZON nach Burns et al. (1953);

DESIPRAMIN, PROMETHAZIN nach Salzmann u. Brodie (1956);

ANILIN, SULFADIMETHOXIN, SULFAGUANIDIN, SULFAMETHOXYDIAZIN nach Bratton u. Marshall (1939);

CHLORDIAZEPOXID nach Beyer u. Sadee (1969);

AMINOPHENAZON nach Brodie u. Axelrod (1950);

MORPHIN nach Woods et al. (1954);

SALICYLSÄURE wurde nach Ansäuern mit 2 Tropfen conc.HCL in Chloroform extrahiert und anschließend in 0.1 n NaOH reextrahiert, Extinktionsmessung bei 300 m μ ;

DIPHENYLHYDANTOIN: Ansäuern mit 1.5 m KH_2PO_4 -Lösung, Extraktion in Chloroform, Reextraktion in 1 n NaOH, Messung bei 235 m μ .

CHININ: Alkalisieren mit 0.1 n NaOH, Extraktion in Heptan, Reextraktion in 0.1 n HCL, Messung bei 250 m μ ;

NITROFURANTOIN wurde nach Alkalisieren mit 0.05 m Natriumtetraborat bei 388 m μ gemessen.

Berechnung des gebundenen Anteils:

Tabelle 2 gibt an, welche Ansätze zur Bestimmung der Bindung nötig waren. Dabei wurde bei den Ansätzen I und II Phosphatpuffer (p_H 7.0) verwendet.

Tabelle 2: Benötigte Ansätze
zur Bestimmung des gebundenen Anteils

Ansatz	Extinktion	Konzentration im Ultrafiltrat
I) 10 ml Puffer ohne Substanz ("Blindwert")	E_p^0	
II) 10 ml Puffer mit Substanz	E_p	c_p
III) 10 g Muskelbrei ohne Subst. ("Blindwert")	E_m^0	
IV) 10 g Muskelbrei mit Substanz	E_m	c_m

Der Wassergehalt des Muskelbreis sei W (ml/g). Dann gilt:

Gesamtmenge der Substanz im Ansatz	$c_p \cdot 10$
davon nicht gebunden	$c_m \cdot 10 \cdot W$

Somit sind $100 \cdot (c_m \cdot W / c_p) \%$ der Substanz nicht gebunden, bzw. der gebundene Anteil beträgt $100 \cdot (1 - c_m \cdot W / c_p) \%$. Die angefertigten Eichkurven zeigten, daß im entsprechenden Konzentrationsbereich das Lambert-Beersche Gesetz erfüllt ist. Daher können in obiger Formel die Konzentrationen durch die Extinktionen ausgedrückt werden. Damit ergibt sich:

$$\text{Bindung (in \%)} = \left(1 - \frac{E_m - E_m^0}{E_p - E_p^0} \cdot W\right) \cdot 100$$

III. ERGEBNISSE

1) In Tabelle 3 sind die erhaltenen Werte für die Bindung von 22 Substanzen an menschliches Muskelgewebe zusammengestellt. Um individuelle Unterschiede der Bindung (s.u.) auszuschalten und vergleichbare Ergebnisse zu erhalten, wurde die Bindung mehrerer Substanzen am gleichen Homogenat bestimmt, das aus Muskeln verschiedener (5 - 8) Individuen hergestellt wurde. Die Substanzen, deren Bindung am gleichen Homogenat bestimmt wurde sind in der Tabelle jeweils in Gruppen (I - IV) zusammengefaßt. Zusätzlich wurde in den Gruppen II - IV eine Substanz aus Gruppe I mit bestimmt, um auch die verschiedenen Gruppen untereinander vergleichen zu können.

Zum Vergleich sind in Tab. 3 außerdem die aus der Literatur ermittelten Werte für die Bindung der Substanzen an Plasma und Hämoglobin angegeben.

Der an Muskelgewebe gebundene Anteil reichte bei den 15 Säuren von 31.6% (Barbital) bis 94.0% (Thiamylal), bei den 7 Basen von 13.4% (Aminophenazon) bis 98.4% (Desipramin).

2) Zur Klärung der Frage, ob individuelle Unterschiede der Muskelbindung bestehen, wurde für einige Pharmaka die Bindung an Muskelgewebe verschiedener Individuen bestimmt. Die in Tabelle 4 aufgeführten Ergebnisse zeigen, daß solche Unterschiede bestehen können und diese nicht durch den verschiedenen Wassergehalt der einzelnen Muskeln zu erklären sind.

3) Abbildung 3 zeigt, daß die Bindung abnimmt, wenn das Muskelhomogenat verdünnt wird. Bei hoch gebundenen Substanzen ist die Abnahme der Bindung erst bei stärkerer Verdünnung des Homogenates ausgeprägt. Bei den weniger gebundenen Substanzen besteht im ganzen Bereich eine deutliche Abhängigkeit der Bindung von der Homogenatkonzentration.

Tabelle 3

Substanz	Gebundener Anteil (in %)		Plasma	% ionisiert bei $p_H = 7.0$	Wassergehalt des Muskelhomogenates (%)
	<u>Muskel</u>	<u>n</u>			
I)					
Barbital	31.6 ± 0.7	10	—	14	75.8
Phenobarbital	66.9 ± 1.4	10	50.7 (G)	39	
Hexobarbital	60.5 ± 0.8	13	54.8 (F)	6	
Methohexital	82.9 ± 2.0	14	83.9 (F)	5	
Thiobutabarbital	78.8 ± 0.4	10	71.8 (F)	29	
Thiopental	90.0 ± 0.6	10	87.2 (F)	26	
Thiamylal	94.0 ± 0.2	10	93.4 (K)	31	
II)					
Nitrofurantoin	58.4 ± 0.5	13	77.1 (F)	39	76.3
Oxiphenbutazon	79.4 ± 0.3	10	92.7 (G)	> 99	
Phenylbutazon	90.1 ± 0.4	10	98.8 (F)	> 99	
Chinin	90.6 ± 0.3	10	70.6 (F)	97	
Promethazin	96.9 ± 0.5	10	82.7 (G)	> 99	
Desipramin	98.4 ± 0.2	12	81.2 (K)	> 99	
	+ Methohexital	83.7			

Fortsetzung der Tabelle nächste Seite

III)

Salicylsäure	43.3 ± 0.6	10	50.4	82.1 (F)	> 99	75.1
Diphenylhydantoin	88.3 ± 1.2	14	79.4	85.8 (G)	< 1	
Aminophenazon	13.4 ± 1.0	10	13.7	—	1	
Morphin	53.8 ± 2.3	10	—	42.1 (G)	94	
Chlordiazepoxid	88.8 ± 0.3	10	75.5	97.8 (K)	< 1	
	+ Thiopental	91.9				

IV)

Anilin	54.7 ± 0.9	10	53.0	37.3 (F)	< 1	74.9
Sulfaguanidin	55.4 ± 0.5	10	—	29.2 (F)	< 1	
Sulfamethoxydiazin	64.3 ± 0.5	10	—	90.1 (G)	49	
Sulfadimethoxin	73.2 ± 0.7	10	60.3	97.5 (G)	83	
	+ Thiopental	92.1				

Tabelle 3:

Zusammenstellung der ermittelten Werte für die Bindung der Substanzen an Muskelhomogenat

Angegeben ist der gebundene Anteil (in Prozent) mit dem mittleren Fehler des Mittelwertes und die Anzahl der Messungen (n). Die Bestimmung der Bindung der innerhalb einer der Gruppen I-IV zusammengefaßten Substanzen erfolgte jeweils am gleichen Homogenat (s. Text). Daneben sind die Werte für die Bindung an Hämoglobin (Hilzenbecher 1972) und Plasma aufgeführt. Die Angaben für die Plasmabindung stammen aus folgenden Quellen: F = Friemel (1968); G = Ganshorn u. Kurz (1968); K = Kurz (unveröffentlicht).

Der Ionisationsgrad wurde mit Hilfe der pK-Werte von Tabelle 1 berechnet.

Substanz	Wassergehalt (in g%) des Muskelhomogenates	Gebundener Anteil (in %)	n	
Hexobarbital	76.8	63.4 $\pm$ 0.8	6	nicht signifikant
	76.0	62.7 $\pm$ 0.8	4	
Phenylbutazon	76.8	89.3 $\pm$ 0.8	4	p = 0.002
	76.1	82.6 $\pm$ 0.5	3	
Sulfadimethoxin	76.0	75.6 $\pm$ 0.2	4	p < 0.001
	76.5	63.4 $\pm$ 0.6	10	
Sulfamethoxydiazin	75.7	63.1 $\pm$ 1.0	4	p = 0.02
	76.0	59.1 $\pm$ 0.4	4	
Thiopental	75.8	92.2 $\pm$ 0.3	3	nicht signif. (p>0.05) p = 0.002
	75.8	91.6 $\pm$ 0.2	3	
	76.4	88.3 $\pm$ 0.4	3	

Tabelle 4: Unterschiede der Muskelbindung bei verschiedenen Individuen

Der an Muskeln von 2 bzw. 3 verschiedenen Individuen gebundene Anteil der Substanzen ist mit dem Fehler des Mittelwertes und der Zahl der Messungen n aufgeführt. In der letzten Spalte ist angegeben, mit welcher Irrtumswahrscheinlichkeit p die beobachteten Unterschiede signifikant sind. (Berechnung von p mittels des t-Testes)

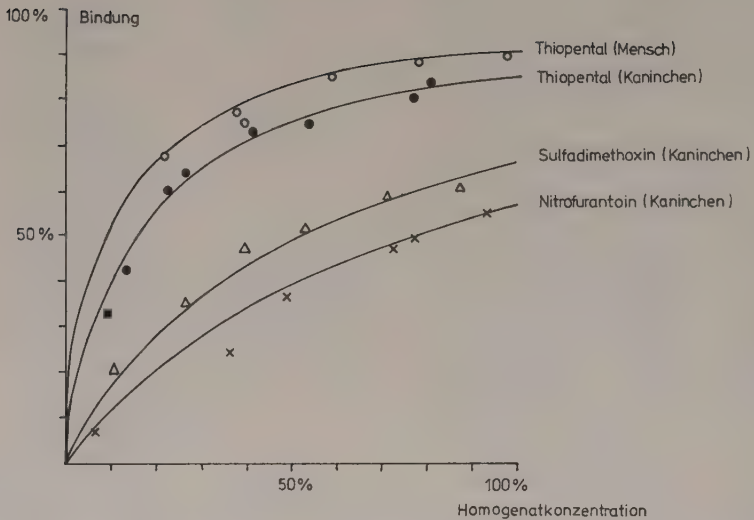


Abbildung 3: Abhängigkeit der Bindung (in %) von der Konzentration des Muskelgewebes im Homogenat (in g%)

Zu Abbildung 3:

Die Meßpunkte in Abb.3 passen sich recht gut den ausgezogenen Kurven an. Diese Kurven gehorchen alle der Gleichung

$$B = \frac{100}{1 + \frac{100}{k \cdot H}} \quad (Gl.1)$$

Dabei ist B der gebundene Anteil (in %), H die Konzentration des Muskelgewebes (in g%). Die Konstante k ist für jede Substanz verschieden. Sie läßt sich aus den Meßpunkten wie folgt ermitteln (Gillette 1963):

Falls sich im Muskelbrei nur eine Art von Bindungsstellen befindet, lautet das Massenwirkungsgesetz für die Bindung einer Substanz an das Muskelgewebe:

$$c_b = A \cdot c_f \cdot (b - c_b) \quad (\text{Gl.2})$$

worin c_b bzw. c_f die Konzentration an gebundener bzw. freier Substanz, b die Konzentration der Bindungsstellen im Homogenat bedeutet. A ist die Assoziationskonstante.

Nimmt man an, daß die Anzahl der Bindungsstellen groß ist gegenüber der Anzahl der gebundenen Moleküle, so vereinfacht sich Gl.2 zu:

$$c_b = A \cdot c_f \cdot b \quad (\text{Gl.3})$$

Bezeichnet man die Konzentration der Bindungsstellen im unverdünnten Homogenat mit b_0 , so gilt für ein verdünntes Homogenat:

$$b = b_0 \cdot H/100$$

Dies ergibt nach Einsetzen in Gl.3:

$$c_b/c_f = A \cdot b_0 \cdot H/100$$

und wenn man $A \cdot b_0$ gleich k setzt:

$$c_b/c_f = k \cdot H/100 \quad (\text{Gl.4})$$

Mit Hilfe von Gl.4 läßt sich k einfach graphisch ermitteln, indem man den Quotienten c_b/c_f gegen die Homogenatkonzentration aufträgt.

Die oben (S.14, Gl.1) angegebene Beziehung zwischen Bindung und Homogenatkonzentration ergibt sich durch einfache Umformung aus Gl.4, wenn man berücksichtigt, daß der gebundene Anteil B einer Substanz gleich $100 \cdot c_b/(c_b + c_f)$ ist.

IV. DISKUSSION

A) Kritik der Methode

1) Herstellung des Muskelhomogenates

Abbildung 3 zeigt, daß die Größe des gebundenen Anteils von der Konzentration des Muskelbreis abhängt. Deshalb wurde ein möglichst wenig verdünntes Homogenat verwendet. Bei einem Muskelanteil von 95% war der Brei von zäher, pastenartiger Konsistenz. Man muß sich fragen, ob in diesem zähen Brei das Muskelgewebe mit der oben angegebenen Methode genügend homogenisiert werden kann. Wird nämlich keine vollständige Homogenisierung erreicht, so wäre denkbar, daß eine schlecht lipidlösliche Substanz sich nur in einem kleinen Volumenanteil des Homogenates verteilen kann. Die dadurch höhere Konzentration im Ultrafiltrat würde dann eine zu niedrige Bindung vortäuschen. Um dies zu prüfen, wurde so vorgegangen: Wie üblich hergestellter Muskelbrei wurde mit isotoner NaCl-Lösung so weit verdünnt, daß er mit dem von v. Jagow et al. (1965) angegebenen Homogenisator weiter bearbeitet werden konnte. Ein Teil des verdünnten Breis wurde mit dem genannten Gerät weiter homogenisiert, der Rest blieb unverändert. Nach Zugabe von Sulfaguanidin und Ultrafiltration wurde bei beiden Ansätzen im Ultrafiltrat die gleiche Sulfaguanidin-Konzentration gefunden. Das gründlichere Homogenisieren vergrößerte das Verteilungsvolumen einer wenig lipidlöslichen Substanz wie Sulfaguanidin im Muskelbrei nicht. Man kann daher annehmen, daß der Grad der Homogenisation bereits nach dem ersten Schritt ausreichend war.

2) Ultrafiltration

Es gibt eine Vielzahl von Möglichkeiten, die Bindung von Substanzen an Proteine zu untersuchen. So werden von Chignell (1971) z.B. 19 Methoden aufgeführt. Am häufigsten angewendet werden Ultrafiltration, Gelfiltration, Ultrazentrifugation und Dialyse. Bei

letzterer Methode ist der Fehler am geringsten (Kurz u. Trunk 1967). Da in dem dickflüssigen Gewebshomogenat keine Konvektion erfolgen kann, würde jedoch die benötigte Dialysierzeit sehr lang werden bzw. ein Konzentrationsausgleich durch Diffusion in vertretbarer Zeit nicht möglich sein. Für die vorliegenden Untersuchungen wurde daher die Ultrafiltration verwendet.

In der Literatur wird die Ultrafiltration unterschiedlich bewertet. So kommt Scholtan (1961) zu dem Schluß, daß mittels Ultrafiltration "exakte quantitative Angaben nur bedingt erhältlich" sind. v.Bruck und Kuhne (1962) halten die Ultrafiltration zur Bestimmung der Eiweißbindung für "ungeeignet".

Dem stehen Mitteilungen gegenüber über befriedigende Übereinstimmung von Ultrafiltration und Dialyse (Garn u. Kimbel 1961); Schach v.Wittenau u. Yearly 1963; Kunin 1966a). Auch Spring (1966) weist auf die "gute Übereinstimmung" seiner Dialyse-Werte mit denen von Rieder (1963) hin, die durch Ultrafiltration gewonnen wurden.

Folgende Fehlermöglichkeiten kommen bei der Ultrafiltration in Betracht:

- A) Adsorption an die Filtermembran,
- b) Siebeffekt,
- c) Einflüsse einer evtl. Membranladung.

Dazu bei der Filtration von eiweißhaltigen Lösungen:

- c) Behinderung der Membranpassage durch Proteinmoleküle,
- d) Zunahme der Eiweißkonzentration
- e) Donnan-Effekt.

Zu a) Durch eine Adsorption der Substanzen an die Filtermembran wird die Konzentration im Ultrafiltrat niedriger sein als in der Ausgangslösung und erst im Verlauf des Filtrationsprozesses die Ausgangskonzentration erreichen (Scholtan 1961). Die Stärke dieses Effektes ist bei den einzelnen Membran-Typen verschieden. Nach Craig und King (1966) werden von der "Visking"-Membran sehr viele Substanzen nur geringfügig adsorbiert. (Vgl. auch unten Tab.5.)

Zu b) Zwischen Ultrafiltrat und Ausgangslösung tritt eine Konzentrationsdifferenz auf (Flexner 1937), die um so größer ist, je größer die Filtrationsgeschwindigkeit und das Verhältnis Molekülgröße/Porenradius sind (Renkin 1955). Es ist daher ratsam, die Filtrationsgeschwindigkeit bzw. den Filtrationsdruck klein zu halten. Scholtan (1961) und v.Bruck u. Kuhne (1962) verwendeten bei ihren Versuchen einen ziemlich hohen Filtrationsdruck (7.5 bis 10 at!), was vermutlich mit zu ihren schlechten Ergebnissen mit der Ultrafiltration beigetragen hat. Bei den hier vorliegenden Versuchen lag der Filtrationsdruck in der Größenordnung von 0.5 - 1 at.

Zu c) Eine etwaige elektrische Ladung der Membran kann die Ultrafiltration von ionisierten Substanzen beeinflussen (Willbrandt 1934; Teorell 1953). Nach Craig u. Ansevin (1963) trägt die "Visking"-Membran praktisch keine fixierten Ladungen.

Ein weiterer Vorteil der "Visking"-Membran ist die relativ gleichmäßige Verteilung der Porenweiten (nach Renkin (1955) $14 \pm 7 \text{ \AA}$, dagegen bei der von v.Bruck u. Kuhne (1962) verwendeten Membran 10 - 80 $\text{\AA}$).

Die unter a - c genannten Effekte führen zu einer "Filtrationshemmung". Zu deren Beurteilung kann der Quotient aus den Konzentrationen einer Substanz im Ultrafiltrat und in der Ausgangslösung dienen. Der so definierte "Siebkoeffizient" wird um so mehr vom Idealwert 1 abweichen, je stärker der Einfluß der obengenannten Effekte ist.

In Tabelle 5 sind die Siebkoeffizienten für einige der untersuchten Substanzen aufgeführt. Die Werte zeigen, daß die Filtrationshemmung i.a. gering ist. Bei manchen Substanzen tritt aber auch bei den hier gewählten Versuchsbedingungen ein starker Rückhalteeffekt auf. Bei Toloniumchlorid (starke Bindung an die Membran!) und Meti-cillin war die Filtrationshemmung so groß und auch von wechselndem Ausmaß, daß eine zuverlässige Bestimmung der Bindung nicht möglich erschien.

Salicylsäure	1.0
Aminophenazon	1.0
Nitrofurantoin	0.92 - 0.99
Hexobarbital	0.96 - 0.98
Methohexital	1.0
Sulfamethoxydiazin	1.0
Desipramin	0.90 - 0.96
Phenylbutazon	0.98
Sulfadimethoxin	0.96
Promethazin	0.98
Chinin	0.99
Oxiphenbutazon	0.98
Chlordiazepoxid	0.98

Tabelle 5: Größe des Siebkoeffizienten (= Konzentration im Ultrafiltrat / Konzentration in Ausgangslösung)

Zu d) v.Bruck u.Kuhne (1962) fanden bei der Ultrafiltration von Serum einen wechselnden zusätzlichen Rückhalteeffekt durch das Eiweiß. Bei den eigenen Versuchen ist der Fehler der Mittelwerte (Tab. 3) zum Teil sicher auf entsprechende Effekte zurückzuführen.

Zu e) Falls die Bindung an die Proteine dem Massenwirkungsgesetz gehorcht, führt die Zunahme der Eiweißkonzentration im Verlauf der Ultrafiltration nicht zu einer Änderung der Konzentration an ungebundener Substanz (Keen 1965). Dennoch empfiehlt es sich, nur einen kleinen Teil des Gesamtvolumens abzufiltrieren. Mit zunehmender Konzentrierung der Eiweiße in der Ausgangslösung nimmt nämlich der Einfluß der unter d) und f) genannten Effekte zu.

Zu f) Bei der Bestimmung der Proteinbindung von ionisierten Substanzen mittels Ultrafiltration ist der Einfluß des Donnanefektes zu berücksichtigen (Keen 1966). Unabhängig von einer evtl. Bindung treten dadurch nämlich zwischen Ultrafiltrat und Ausgangslösung Konzentrationsunterschiede auf. Das Verhältnis der Konzentrationen eines Ions im Ultrafiltrat und in der Ausgangslösung entspricht um so genauer dem theoretisch zu erwartenden Donnanfaktor (r), je ge-

ringer die Filtrationsgeschwindigkeit und je größer die Membranpermeabilität ist (Ingraham et al. 1933; Flexner 1937).

Um die Größe des Donnanfaktors r bei den vorliegenden Versuchen abzuschätzen, gehen wir von folgender Formel¹⁾ aus:

$$r = \sqrt{\frac{An_1}{An_1 + Pr}}$$

An_1 = Konzentration der
diffusiblen Anionen;
 Pr = Konzentration der
Proteinanionen

Legt man die Werte von Gamble (aus Rein u. Schneider 1971) für die intrazellulären Elektrolytkonzentrationen im Muskel zugrunde, so ergibt sich $r \approx 0.87$. Dieser Wert ist aber nur als untere Grenze zu betrachten, da die Muskelproteine nur zum Teil in Lösung sind.

Durch einen Donnanfaktor dieser Größenordnung werden die hier mitgeteilten Bindungswerte nur wenig beeinflusst, wie folgende Überlegungen zeigen:

a) Nur ionisierte Moleküle werden durch einen Donnaneffekt beeinflusst.

Von den untersuchten Substanzen ist ein Teil bei p_H 7 praktisch ungeladen und ein weiterer Teil nur wenig ionisiert (s. Tab.3). Wenn die Konzentration einer völlig ionisierten anionischen Substanz auf Grund des Donnaneffektes im Ultrafiltrat 1.1 mal so groß ist wie in der Ausgangslösung ($r = 0.90$), so sinkt dies Verhältnis der Konzentrationen bei einem Ionisationsgrad von 50% auf 1.06 und bei einem Ionisationsgrad von 33% auf 1.04.

1) Ableitung der Formel: Es sei Kat bzw. An die Konzentration der Kationen und Anionen, die Indices a und i bedeuten außerhalb bzw. innerhalb der Proteinklösung. Dann gilt:

$$r = \frac{Kat_a}{Kat_i} = \frac{An_i}{An_a} ; \text{ und } \frac{Kat_a}{Kat_i} = \frac{An_a}{An_i + Pr} \quad (\text{Elektroneutralitätsbedingung})$$

$$\text{Daher } r^2 = \frac{An_a}{(An_i + Pr)} \cdot \frac{An_i}{An_a}$$

b) Der Donnaneeffekt beeinflusst nur ungebundene Moleküle. Mit zunehmender Bindung wird der Einfluß von r also immer geringer. So ergibt die Vernachlässigung der Donnankorrektur bei einer völlig dissoziierten anionischen Substanz eine Bindung von 45% statt richtig 50% und 89% statt richtig 90%!

Ein Einfluß von r ist also am ehesten bei stark dissoziierten Substanzen mit niedriger Bindung zu erwarten, was bei den hier untersuchten Substanzen auf Morphin und Salicylsäure zutrifft. Die Bindungswerte für diese beiden Substanzen sind also möglicherweise um wenige Prozente zu niedrig (S.) bzw. zu hoch (M.).

Für die meisten Substanzen sind die entsprechenden Korrekturen ziemlich klein und liegen z.T. im Bereich des Meßfehlers. Deshalb und angesichts der Tatsache, daß der genaue Wert von r nicht bekannt ist, wurde auf eine Korrektur der Ergebnisse von Tab.3 verzichtet.

3) Berechnung des gebundenen Anteils

In die zur Berechnung der Bindung verwendete Formel (s. oben, S.9) geht der Wassergehalt des Muskelbreis ein. Dabei ist vorausgesetzt, daß das gesamte Muskelwasser als Lösungsmittel für die Substanzen zur Verfügung steht, also kein nichtlösender Anteil besteht. Diese Annahme stützt sich auf Versuche, die zeigten, daß das gesamte Wasser (einschließlich Hydratationswasser) von Muskel, Plasma, Erythrocyten und anderen Kolloidsystemen zur Lösung niedermolekularer Stoffe zur Verfügung steht (Hill 1930; Sundermann 1932; Greenberg u. Greenberg 1933). Hills Ergebnisse für den Muskel wurden später auch von Boyle u. Conway (1941) und Dydynska u. Wilkie (1963) bestätigt.

4) Abhängigkeit der Bindung von der Homogenatkonzentration

Wie Abb.3 zeigt, ist das Ausmaß der Bindung von der Homogenatkonzentration abhängig. Auch bei hoch gebundenen Substanzen wird mit zunehmender Homogenatkonzentration keine "Plateau-Zone" erreicht. Daher müssen die Messungen an möglichst wenig verdünntem Homogenat erfolgen. Die dabei auftretenden technischen Schwierig-

keiten versuchten Goldbaum u. Smith (1954) zu umgehen, indem sie die Bindung an verdünntem Homogenat bestimmten und die erhaltenen Werte mit der Bindung an Plasma verglichen, das im gleichen Verhältnis verdünnt war. Dieses Verfahren ist aber nicht korrekt. So ist z. B. denkbar, daß eine Substanz am Muskel nach Art der Kurve für Thiopental aus Abb. 3 gebunden wird und im Plasma nach Art des Nitrofurantolins. Das ergäbe dann bei einem 20%igen Homogenat bzw. Plasma ein Verhältnis der Bindungen von 3 : 1 (65% zu 21%), während dies Verhältnis ohne Verdünnung nur 1.8 : 1 ist (90% zu 50%).

Eine andere Möglichkeit besteht darin, mehrere Messungen bei verschieden stark verdünntem Homogenat durchzuführen und dann auf ein unverdünntes Homogenat zu extrapolieren. Da mit verdünntem Homogenat relativ leicht zu arbeiten ist, wird diese Methode viel verwendet (z.B. Schanker u. Morrison 1965; Kuntzmann et al. 1967; Gigon et al. 1969; Nielsen u. Cotman 1971). Im Prinzip geht man dabei so vor, daß man die auf dem Massenwirkungsgesetz beruhende Bindungsgleichung durch geeignete Transformation der Variablen linearisiert und dann den Meßpunkten eine Gerade anpaßt. Aus deren Verlauf können die Bindungsparameter entnommen werden (Goldstein 1949; Rosenthal 1967). Die Anwendung dieser Methode auf die Abhängigkeit der Bindung von der Konzentration eines Organhomogenates ist bei Gillette (1963) beschrieben (vgl. auch oben S. 14).

Auch dies Vorgehen hat Nachteile:

Jede Extrapolation ist grundsätzlich mit einer gewissen Unsicherheit behaftet. Will man sichergehen, daß die Extrapolation zulässig ist, muß man doch bei hohen Homogenatkonzentrationen messen. Weiterhin beruht die genannte Methode auf bestimmten Voraussetzungen (nur eine Art von Bindungsstellen; Zahl der Bindungsstellen sehr viel größer als Anzahl der gebundenen Moleküle). Sind diese Voraussetzungen nicht erfüllt, so ist eine Linearisierung der Bindungsgleichung und damit eine einfache graphische Auswertung nicht mehr möglich.

Auf eine weitere Fehlermöglichkeit bei der Auswertung von Bindungsversuchen weist Krüger-Thiemer hin. Die Meßpunkte werden bei den verschiedenen Verfahren zur Linearisierung mit unterschiedlichen

Gewichten belegt, was zu unterschiedlichen Ergebnissen führen kann. So schwankte der Wert für die Bindungskonstante, der für einen bestimmten Satz von Meßpunkten ermittelt wurde, in Abhängigkeit von der verwendeten Umformung zwischen 10 und 15 (Krüger-Thiemer 1964) !

5) Bestimmung der Bindung am homogenisierten Muskel

Die Bindung wurde an homogenisiertem Gewebe bestimmt, was drastische Änderungen gegenüber dem Zustand in vivo bedeutet und möglicherweise Änderungen der Bindungseigenschaften des Muskels zur Folge hat. So fanden z.B. Kuntzmann et al. (1967), daß die in vitro gemessenen Bindungswerte die Verhältnisse qualitativ richtig wiedergeben, die Absolutwerte aber geringer waren, als auf Grund der Verteilung in vivo zu erwarten stand. Auch können Gewebe in vivo u.U. Pharmaka mittels "aktiver" Transportprozesse aufnehmen. Schanker u. Morrison (1965) konnten zeigen, daß die Aufnahme von Guanethidin in Herzmuskelzellen auf zwei Wegen erfolgt: durch Diffusion ins Zellinnere (und Bindung) und zusätzlich durch einen speziellen Prozeß, der durch anaerobe Verhältnisse zu hemmen war. An Gewebshomogenaten in vitro bestimmte Bindungswerte sind daher u.U. nur "untere Grenzwerte" der Gesamtbindung in vivo.

Weiter werden beim Homogenisieren die Zellmembranen zerstört. Eine Substanz, die in vitro am Homogenat gebunden wird, kann in vivo nur dann im gleichen Ausmaß an die Zellbestandteile (z.B. Muskelproteine) gebunden werden, wenn sie ausreichend lipidlöslich ist, um die Zellmembranen zu passieren. Dies dürfte aber bei den hier untersuchten Substanzen möglich sein. Unter ihnen hat das Sulfaguanidin den niedrigsten Verteilungskoeffizienten im System Heptan/Wasser (10^{-3} ; Raaf-laub 1970), das sich gut zur Beschreibung des Permeationsverhaltens von Körpermembranen eignet (Appiah 1971). Dennoch gelangt diese Substanz so rasch in die Muskelzelle, daß ihre Konzentration im Gewebswasser nach spätestens 135 min gleich der im Plasmawasser ist (Wilson u. Brodie 1961).

Es erhebt sich noch die Frage, an welche Bestandteile des Muskels die Bindung erfolgt. Da im Muskel bis zu 90% der Trockensubstanz aus Eiweiß besteht (Reichel 1960), kann man annehmen, daß die Substanzen an Proteine gebunden werden. Von den kontraktilen Proteinen

ist bekannt, daß sie Farbstoffe (Filatova und Shtrankfeld 1968) und Arzneimittel zu binden vermögen, z.B. Herzglykoside (Genazzani u. Santamaria 1969) und Phenothiazine (Levine et al. 1968).

Daneben kann, besonders bei Basen, eine starke Bindung an subzelluläre Partikel erfolgen (Arora et al. 1963; Dingell et al. 1961).

B) Besprechung der Ergebnisse

1) Bindung an Muskelhomogenat

Die Ergebnisse von Tab. 3 zeigen, daß alle untersuchten Substanzen mehr oder weniger stark an Muskelgewebe gebunden werden. Bei der Hälfte (11) der Substanzen liegt der gebundene Anteil über 75%. Auch bei der Plasma- und Hämoglobinbindung der Substanzen von Tab. 3 sind hohe Werte häufiger.

2) Individuelle Unterschiede der Muskelbindung

In der Literatur finden sich für viele Substanzen Angaben über individuelle Unterschiede der Plasmabindung. So wurde z.B. Sulfamethoxydiazin von 12 Sären zwischen 69 und 82 % gebunden (Scholtan 1961). Die Penicillinbindung variierte bei 6 Personen zwischen 43 und 52 % (Rolinson u. Sutherland 1965). Die Bindung von Chlorpromazin schwankte zwischen 91 und 99 % (Curry 1970a). Die Desipraminbindung von 40 Plasmen reichte von 87 bis 93 % (Borga 1969).

Die Ergebnisse von Tabelle 4 zeigen, daß auch bei der Muskelbindung Unterschiede zwischen einzelnen Individuen bestehen können. Dies ist insofern von Bedeutung, als solche Unterschiede beim Muskel größere Auswirkungen haben müssen (vgl. oben Abb. 1). Die bei gleicher Dosierung eines Pharmakons auftretenden unterschiedlichen Serumkonzentrationen bei verschiedenen Individuen können daher mit durch eine unterschiedliche (Muskel-)Gewebsbindung bedingt sein.

Aus der Tabelle geht weiterhin hervor, daß die Unterschiede nicht allein durch den unterschiedlichen Gehalt an festen Bestandteilen im Homogenat zu erklären sind.

3) Vergleich des Bindungsvermögens von Muskel, Plasma und Hämoglobin

Die in Tab.3 aufgeführten Werte der Hämoglobin- und Plasmabindung stammen aus einer Arbeitsgruppe (Kurz et al.) und sind unter gleichen Versuchsbedingungen gemessen. Die Temperatur lag bei 4°C . Der p_{H^+} -Wert war 7.4 gegenüber 7.0 bei der Bestimmung der Muskelbindung. Dies entspricht den Verhältnissen in vivo. Die Substanzkonzentration war allerdings nur halb so groß wie bei den Versuchen der vorliegenden Arbeit. Dennoch ist ein Vergleich möglich, da in diesem Konzentrationsbereich ($1 - 2 \cdot 10^{-4}\text{m}$) die Plasmabindung wenig konzentrationsabhängig ist (Keen 1971). Plasma und Muskel waren nur geringfügig verdünnt. Hingegen war bei den Versuchen zur Hämoglobinbindung die Hämoglobinkonzentration niedriger als im Erythrocyten in vivo. Ein Vergleich ist aber auch hier insofern möglich, als die Hämoglobinkonzentration bei den genannten Versuchen (25g%) dem Trockengewicht des Muskelbreis von rund 24 g% entspricht.

Bei Betrachtung der Ergebnisse von Tab.3 sieht man, daß nur bei zwei Substanzen (Oxiphenbutazon und Salicylsäure) die Bindung an Hämoglobin größer ist als an Muskelgewebe. Bei Barbital, Aminophenazon und Anilin ist die Bindung ungefähr gleich. Die übrigen 13 Substanzen werden vom Muskel - z.T. erheblich - stärker gebunden.

Anders ist das Verhältnis von Plasma- und Muskelbindung. Bei 7 Substanzen ist die Muskelbindung geringer als die Plasmabindung (Sulfamethoxydiazin, Sulfadimethoxin, Phenylbutazon, Oxiphenbutazon, Nitrofurantoin, Salicylsäure und Chlordiazepoxid). Der an Muskel gebundene Anteil ist dagegen höher beim Anilin, Morphin, Chinin, Desipramin, Promethazin, Sulfaguanidin, Phenobarbital, Hexobarbital und Thio-butabarbital.

4) Zusammenhang zwischen der Bindung an Muskelgewebe und an Plasma bzw. Hämoglobin

Scholtan (1964) zeigte, daß bei Eiweißstoffen mit verschiedenem absoluten Bindungsvermögen die Reihenfolge der Bindung für Sulfonamide gleich ist. Ebenso fand Witzgall (1964) eine annähernd gleiche Reihenfolge für die Bindung einer Gruppe von Substanzen an Plasma und an

Bakterien. Entsprechende Befunde für die Bindung von Barbituraten an Kaninchengewebe wurden schon früher von Goldbaum u. Smith (1954) mitgeteilt.

In Abb. 4 ist die Reihenfolge der Bindung von 7 Barbituraten an menschliches Plasma, Muskelgewebe und Hämoglobin dargestellt. Auch hier zeigt sich mit jeweils einer Ausnahme die gleiche Reihenfolge.

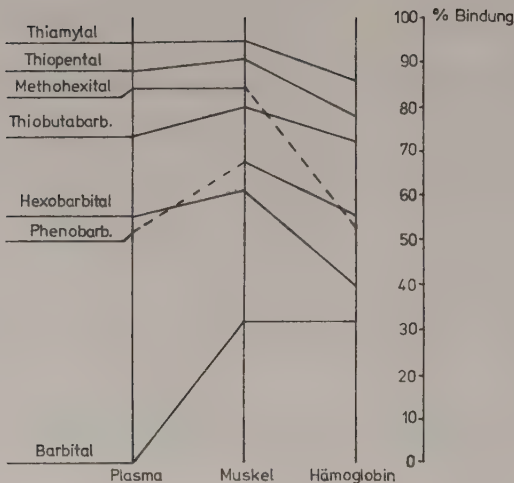


Abbildung 4: Reihenfolge der Bindung von 7 Barbituraten an Plasma, Muskel und Hämoglobin

Abbildung 5a zeigt den Zusammenhang zwischen der Bindung an Hämoglobin und der an Muskel für alle Substanzen, für die vergleichbare Messungen vorliegen.

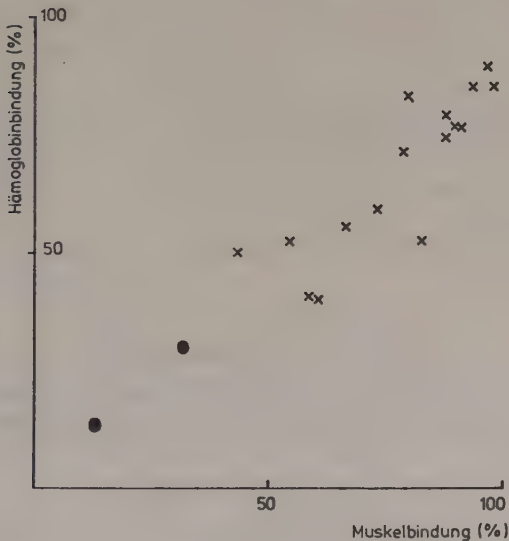


Abbildung 5a: Zusammenhang zwischen der Bindung an Muskelgewebe und an Hämoglobin

Für die durch ein Kreuz symbolisierten Substanzen liegen auch vergleichbare Werte der Plasmabindung vor (vgl. Abb. 5b).

Man erkennt, daß mit steigender Muskelbindung auch die Hämoglobinbindung zunimmt. Die Beziehung zwischen Plasma- und Muskelbindung ist dagegen nicht so ausgeprägt (Abb. 5b). Ein Zusammenhang ist zwar noch erkennbar, aber im Einzelfall kann aus der Größe der Plasmabindung nicht auf die Gewebsbindung geschlossen werden. Entsprechend fanden Schanker u. Morrison(1965), daß Guanethidin im Plasma von Ratten nicht nennenswert gebunden wird, während die Bindung an Herzmuskelhomogenat etwa 70% ist.

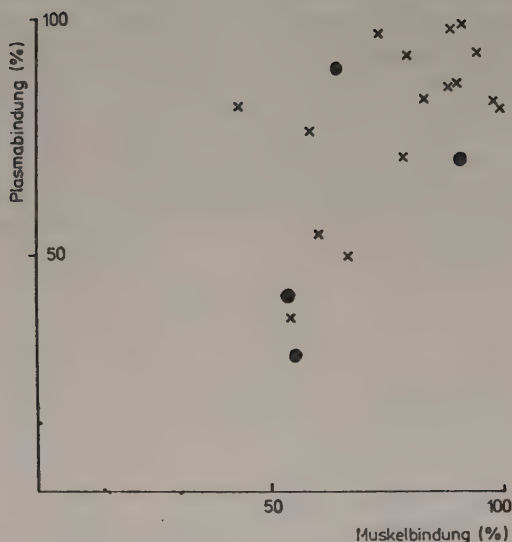


Abbildung 5b: Zusammenhang zwischen Muskel- und Plasmabindung
(Bedeutung der Symbole s. Legende zu Abb. 5a)

5) Abhängigkeit der Muskelbindung vom Ionisationsgrad der Substanzen

In Tabelle 3 ist verzeichnet, welcher Anteil der Substanzen bei p_H 7 in ionisierter Form vorliegt. Bei den praktisch ungeladenen Substanzen (1% Ionen) reicht die Bindung von 13.4% (Aminophenazon) bis 88.8% (Chlordiazepoxid), bei den als Kationen vorliegenden Substanzen von 53.8% (Morphin) bis 98.4% (Desipramin) und bei den Anionen von 43.4% (Salicylsäure) bis 90.1% (Phenylbutazon). Die Bindung von Anionen wird offensichtlich -ähnlich wie beim Albumin- durch die negative Nettoladung der Muskelproteine bei p_H 7 nicht verhindert.

Um einen etwaigen Zusammenhang zwischen dem Ionisationsgrad der Substanzen (in %) und ihrer Bindung an Muskel (in %) zu prüfen, wurden die entsprechenden Rangkorrelationskoeffizienten nach Spearman berechnet. Es ergibt sich:

$r_s = 0,297$ (alle Substanzen)

$r_s = 0,031$ (15 negativ geladene Substanzen)

$r_s = 0,250$ (7 Barbiturate)

$r_s = 0,750$ (7 positiv geladene Substanzen)

Die ersten drei Korrelationskoeffizienten sind nicht signifikant ($p > 0,10$). Für die positiv geladenen Substanzen ist r_s bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 5% eben signifikant. Dabei ist allerdings zu berücksichtigen, daß bei drei dieser Substanzen der Ionisationsgrad kleiner als 1% ist und bei den vier anderen größer als 94%. Für mittlere Ionisationsgrade liegen keine Daten vor. Es kann daher nicht sicher entschieden werden, ob ein Einfluß der Ionisation auf das Ausmaß der Bindung an Muskelgewebe vorhanden ist.

6) Beziehung zwischen der Muskelbindung und der Lipidlöslichkeit der Substanzen

Eine wichtige Eigenschaft von Pharmaka ist ihre Lipidlöslichkeit (Kurz 1970; Raaflaub 1970). Zu ihrer Beurteilung dient der Verteilungskoeffizient der Substanz zwischen einer Lipidphase und einer polaren Phase (meist Wasser oder Puffer). Im allgemeinen sind bei einer Gruppe von Substanzen ihre Verteilungskoeffizienten in den einzelnen Lipidphasen unterschiedlich (vgl. z.B. Feltkamp 1965; Appiah 1971). Eine engere Korrelation zwischen Verteilungskoeffizienten, die in zwei verschiedenen Lipidphasen bestimmt wurden, besteht nur, wenn sich diese in ihren polaren Eigenschaften ähnlich sind. Dann gilt die Beziehung (Collander 1951):

$$\log VK_1 = a + \log VK_2 + b \quad (a \text{ und } b \text{ Konstanten}) \quad (Gl. I)$$

Daher wird sich eine etwaige Korrelation zwischen Bindung und Lipidlöslichkeit von Pharmaka nur dann aufzeigen lassen, wenn man dazu Verteilungskoeffizienten verwendet, die in geeigneten Lipidphasen bestimmt wurden. Zur Beschreibung der für die Proteinbindung maßgeblichen lipophilen Eigenschaften haben sich u.a. die Oktanol/Puffer - Verteilungskoeffizienten als brauchbar erwiesen (Leo et al. 1971).

Abbildung 6 zeigt für die 7 untersuchten Barbiturate den Zusammenhang von Muskelbindung und ihrem Oktanol/Puffer-Verteilungskoeffizienten. Das Ausmaß der Bindung wurde dazu - in Analogie zum Verteilungskoeffizienten - als Quotient aus gebundenem und freiem Anteil (B/F) ausgedrückt (Bird u. Marshall 1967). B/F ist näherungsweise proportional der Bindungskonstanten (s. oben S. 15).

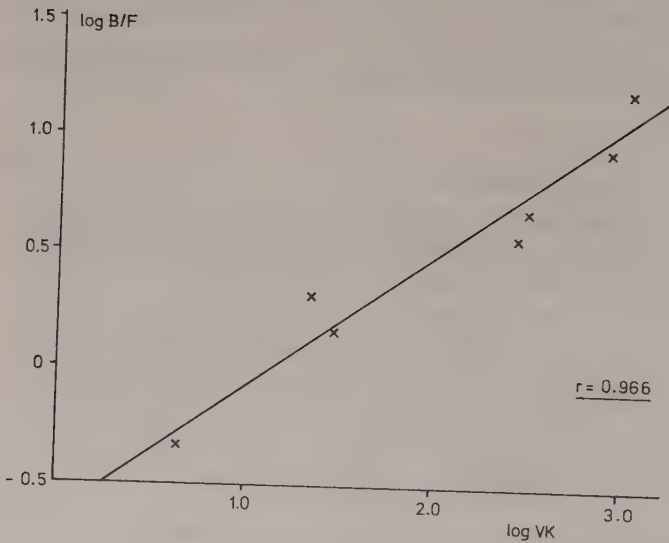


Abbildung 6: Zusammenhang zwischen der Bindung von Barbituraten ($\log B/F$) an Muskelgewebe und ihrem Verteilungskoeffizienten Oktanol - Wasser ($\log VK$). B/F ist das Verhältnis vom gebundenen Anteil zum freien Anteil. Eingezeichnet ist die Regressionsgerade:

$$\log B/F = 0.57 \cdot \log VK - 0.64 \quad (r = 0.966)$$

Die bei p_H 7.4 bestimmten Verteilungskoeffizienten (VK) der Barbiturate (Appiah 1971 u. eigene Messungen) wurden auf p_H 7.0 umgerechnet unter der Annahme, daß nur die nicht ionisierten Moleküle in die organische Phase übergehen¹⁾.

In Abb. 6 sind die Logarithmen von B/F und VK gegeneinander aufgetragen. Man sieht, daß die Punkte annähernd auf einer Geraden liegen. Für die Muskelbindung der sieben Barbiturate gilt also eine zu obiger Gleichung (Gl.I, S. 29) analoge Beziehung:

$$\log B/F = a \cdot \log VK + b \quad (\text{Gl.II})$$

Eine solche Gesetzmäßigkeit für den Zusammenhang von B/F (bzw. der Bindungskonstanten) und dem Verteilungskoeffizienten ist mehrfach beschrieben worden: Sie fand sich für die Albuminbindung von Phenolen, Carbonsäuren, Barbituraten (Lit. bei Leo et al. 1971), Phenothiazinen (Glasser u. Kriegelstein 1970) und verschiedenen anderen Substanzklassen (Scholtan 1968), ebenso für die Serumbindung von Penicillinen (Bird u. Marshall 1967) und für die Hämoglobinbindung verschiedener Verbindungen (Kiehs 1966). Auch die Ergebnisse von Goldbaum u. Smith (1954) über die Gewebsbindung von Barbituraten lassen sich durch obige Beziehung (Gl.II) wiedergeben (Leo et al 1971).

Es ist dabei bemerkenswert, daß die Konstante a in Gl II bei den meisten untersuchten Geweben und Proteinen um 0,5 - 0,6 liegt (bei den eigenen Versuchen $a = 0,57$). Bei der oben (S. 29, Gl. I) angegebenen Beziehung für die in verschiedenen Lipidphasen gemessenen Verteilungskoeffizienten liegt der Wert der Konstanten a meist nahe bei 1 (Leo et al. 1971). Nach Leo et al. ist der niedrigere Wert von a im Falle der Proteinbindung dadurch bedingt, daß sich bei der Bindung die Substanzen an der Oberfläche von Makromolekülen anlagern. Bei einem zu einem Lösungsvorgang analogen Eindringen in

1) Diese Annahme ist nicht immer berechtigt. So können Sulfonamide und Chlorpromazin zu einem geringen Teil auch als Ionen in Oktanol übergehen (Seydel 1966; Murthy u. Zografi 1970). Da die untersuchten Barbiturate bei p_H 7.4 zum großen Teil nicht ionisiert sind, ist ein etwaiger Fehler gering.

das bindende Molekül würden sich für a Werte um 1 ergeben. Auch die Beobachtung von Büch et al. (1970), daß optische Antipoden von Barbituraten eine deutlich verschiedene Eiweißbindung aufweisen können, zeigt den Unterschied zwischen Proteinbindung und einem einfachen Verteilungsvorgang.

Bei einer Gruppe von chemisch ähnlichen Substanzen kann also gezeigt werden, daß die Lipidlöslichkeit einen wichtigen Faktor für die Bindung an Muskelgewebe darstellt. In Abb. 7 a ist der Zusammenhang von $\log B/F$ und $\log VK$ für die 7 Barbiturate und die anderen untersuchten Substanzen dargestellt. Eine Beziehung zwischen Bindung und Lipidlöslichkeit ist auch hierbei noch erkennbar, die Streuung um die Regressionsgerade ist aber beträchtlich. Da die untersuchten Substanzen erhebliche Unterschiede im Ladungszustand aufweisen (vgl. Tab.3), wäre es möglich, daß der für das undissoziierte Molekül berechnete Verteilungskoeffizient ein besserer Vergleichsmaßstab ist. Abb 7 b zeigt, daß die Punkte in diesem Fall enger beieinander liegen. Auch die Punkte für die stark geladenen Substanzen verteilen sich nun einigermaßen symmetrisch um die Regressionsgerade. Die auch jetzt noch große Streuung zeigt jedoch, daß die Bindung nicht allein von den lipophilen Eigenschaften der Substanzen bestimmt wird (vgl. Ahtee 1967; Scholtan 1968).

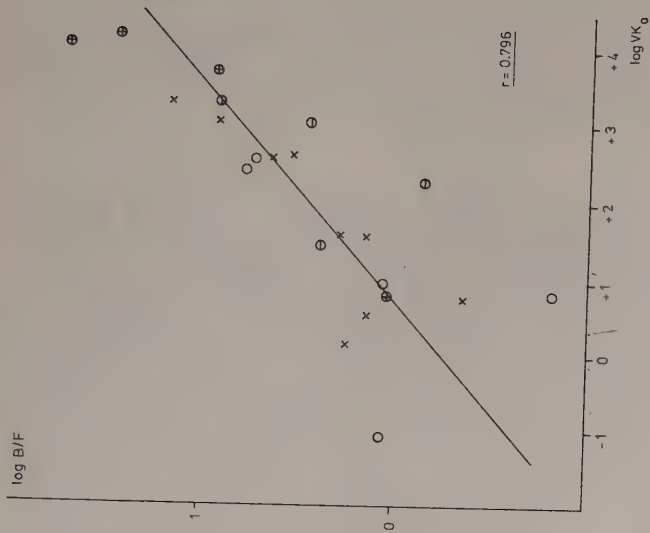
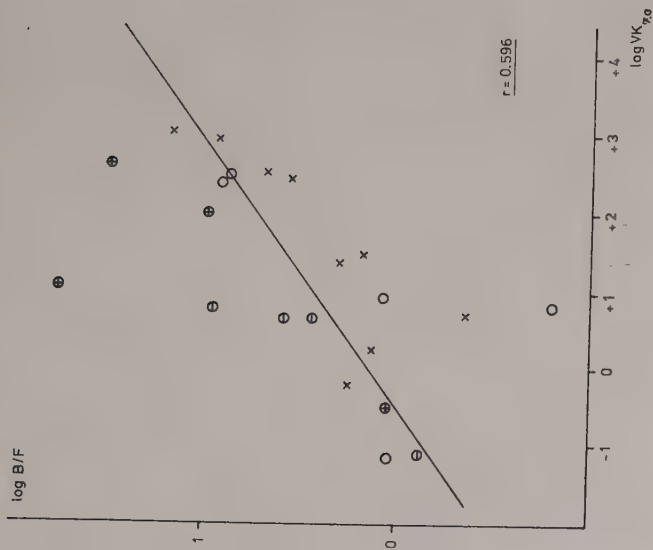


Abbildung 7: Beziehung zwischen Muskelbindung ($\log B/F$) und Verteilungskoeffizient Oktanol-Puffer ($\log VK$) der untersuchten Substanzen

In Abb. 7a sind die Verteilungskoeffizienten bei p_H 7 zugrunde gelegt, in Abb. 7b die für die ungeladenen Moleküle. Die Symbole kennzeichnen den Ladungszustand der Substanzen: $\oplus = >94\%$ Kationen; $\ominus = >80\%$ Anionen; $\times = <50\%$ Anionen; $\circ =$ undissoziiert (1% Ionen).

7) Zusammenhang zwischen Muskelbindung und den in
verschiedenen Lipidphasen gemessenen Verteilungskoeffizienten

Abbildung 8 zeigt für 12 verschiedene Lipidphasen die Beziehung zwischen $\log B/F$ von 5 Barbituraten und dem Logarithmus ihrer Verteilungskoeffizienten (VK nach Appiah 1971, auf p_H 7 umgerechnet).

Die Punkte liegen bei Diäthyläther, Isopentylacetat, Butanol, Oktanol, Olivenöl und Lecithin (Gruppe 1) i.a. recht gut auf einer Geraden, während sie bei Heptan, Petrdäther, Tetrachlor-kohlenstoff, Benzol, Chloroform und Dichloräthan (Gruppe 2) stärker streuen, bedingt durch die hohen Verteilungskoeffizienten der beiden N-methylierten Barbiturate. Auch die Plasmabindung von Barbituraten läßt sich durch die Lipidphasen von Gruppe 1 besser beschreiben (Appiah 1971). Entsprechend fand Kriegelstein, daß die Albuminbindung von Phenothiazinen mit dem Verteilungskoeffizienten Oktanol/Puffer korreliert ist, nicht aber mit dem Verteilungskoeffizienten Heptan/Puffer (Glasser u. Kriegelstein 1970; Kriegelstein u. Kuschinsky 1969).

Die Lösungsmittel der Gruppe 1 gehören nach der Klassifizierung von Sandell (1958) zu den besonders zur Ausbildung von H-Brücken befähigten Lipidphasen. Sie enthalten im Molekülgerüst Sauerstoff als aktiv (OH der Alkohole) oder passiv (O der Ester und Äther) hydrophile Gruppe (Klages 1962). Bei Lipidphasen dieses Typs wird das Verteilungsverhalten von Substanzen außer durch sog. hydrophobe Wechselwirkungen (Kauzmann 1959; Nemethy 1967) auch durch H-Brücken bestimmt (Leo et al. 1971). Die bessere Korrelation von Bindung und Verteilungskoeffizient bei den Lösungsmitteln von Gruppe 1 könnte daher bedeuten, daß bei der Bindung der Substanzen an Muskelgewebe neben hydrophoben Bindungen z.B. Wasserstoffbrücken wesentlich beteiligt sind. Proteine enthalten ja viele zur H-Brücken-Bildung befähigte Gruppen.

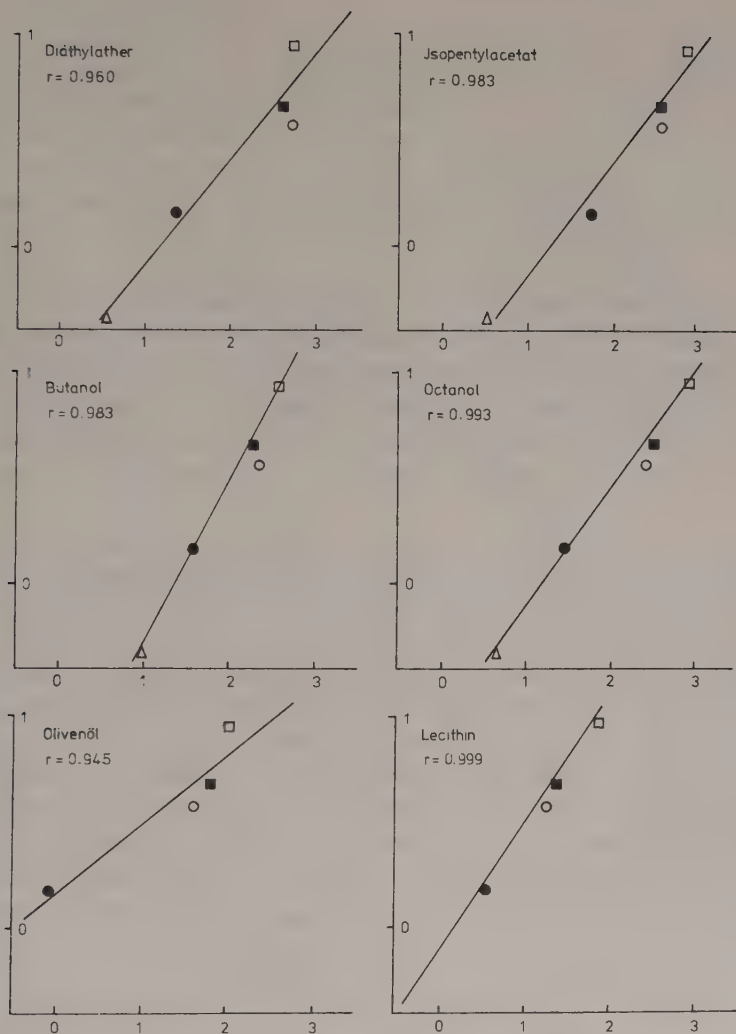


Abbildung 8a: Zusammenhang von Muskelbindung ($\log B/F$, Ordinaten) und den in verschiedenen Lipidphasen gemessenen Verteilungskoeffizienten ($\log VK$, Abszissen) von 5 Barbituraten. Bedeutung der Symbole s. Abb. 8b. Eingezeichnet sind die Regressionsgeraden und die Korrelationskoeffizienten r .

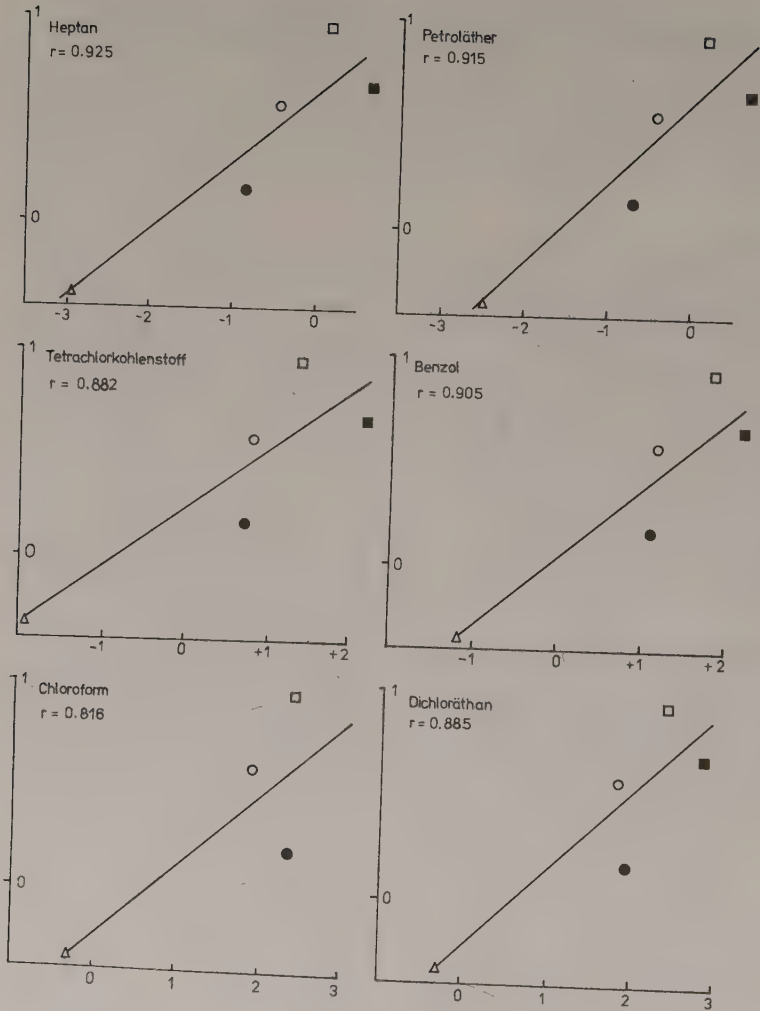


Abbildung 8b: Bedeutung der Symbole: Δ = Barbitol; $\bullet$ = Hexobarbital; $\blacksquare$ = Methohexital; $\circ$ = Thiobutabarbitol; $\square$ = Thiopental.

8) Bedeutung der ermittelten Werte

Bei der Kritik der Methode wurde bereits darauf hingewiesen, daß die am homogenisierten Muskel ermittelten Absolutwerte der Bindung nur mit Vorbehalt auf die Verhältnisse in vivo übertragen werden können. Auch muß beachtet werden, daß Angaben über die Größe der Eiweißbindung einer Substanz einen Gleichgewichtszustand beschreiben. Sind in vivo keine Gleichgewichtsbedingungen gegeben, so ist ein Vergleich mit in vitro gemessenen Bindungsdaten nicht statthaft. Nitrofurantoin wird z.B. vom Muskelhomogenat zu 58% gebunden. Bei einer Plasmabindung von 77% würde man erwarten, daß die Gewebskonzentration etwa die Hälfte der Plasmakonzentration beträgt. In vivo erreicht Nitrofurantoin aber keine nennenswerten Gewebskonzentrationen, da es nur langsam in den intrazellulären Raum eindringt und dort rasch metabolisiert wird (Paul et al. 1960)

Immerhin lassen die Zahlen von Tab. 3 deutlich werden, daß die Bindung an Muskelgewebe in der gleichen Größenordnung wie die Plasmabindung liegt. Weiterhin hat diese Bindung bei vielen Substanzen ein beträchtliches Ausmaß. Wie eingangs erörtert wurde, hat eine Bindung an Muskel einen wesentlich größeren Einfluß als die Plasmabindung. Betrachtet man das Modell von Abb. 1, so sieht man, daß eine Plasmabindung, die niedriger oder gleich der Muskelbindung ist, praktisch kaum einen Einfluß auf die Konzentration an ungebundener Substanz im Körperwasser hat. Die Kenntnis der Größe der (Muskel-)Gewebssbindung ist daher für die Beurteilung der Verteilung von Pharmaka bedeutend wichtiger, als Angaben über die Plasmabindung einer Substanz.

V) ZUSAMMENFASSUNG

Die Bindung von 15 sauren und 7 basischen Pharmaka an homogenisiertes menschliches Muskelgewebe wurde mittels Ultrafiltration bestimmt. Alle untersuchten Substanzen wurden - z.T. erheblich - an Muskelgewebe gebunden. Das Ausmaß der Bindung an Muskeln verschiedener Individuen kann verschieden sein.

Die gemessenen Werte wurden mit Literaturangaben über die Hämoglobin- und Plasmapbindung der Substanzen verglichen. Dabei fand sich eine Korrelation zwischen der Bindung an Muskelgewebe und an Hämoglobin. Der Zusammenhang von Plasma- und Muskelbindung ist dagegen weniger deutlich ausgeprägt.

Ein Einfluß des Ladungszustandes der Substanzen auf ihre Muskelbindung konnte nicht nachgewiesen werden.

Bei einer Gruppe chemisch ähnlicher Substanzen (Barbiturate) zeigte sich, daß mit zunehmender Lipidlöslichkeit auch der an Muskelgewebe gebundene Anteil größer wird. Dabei fanden sich Hinweise darauf, daß die für die Muskelbindung maßgeblichen lipophilen Eigenschaften nicht allein auf sog. hydrophoben Wechselwirkungen beruhen.

Ein Zusammenhang zwischen Lipidlöslichkeit und Muskelbindung fand sich auch bei den übrigen untersuchten Substanzen.

Auf Grund des großen Anteils der Muskulatur an der Körpermasse ist die Bindung an Muskelgewebe von größerer Bedeutung für die Verteilung von Pharmaka im Organismus als die Bindung an Plasma oder Hämoglobin.

LITERATURVERZEICHNIS

AHTEE, L., MATTILA, M.J., VAPAATALO, H.J.

The binding of some phenothiazines to human serum in vitro.

Biochem. Pharmacol. 16, 2432 - 2435 (1967)

APPIAH, A.

Eignung verschiedener Verteilungsmodelle zur Beurteilung der Permeabilität biologischer Membranen für Arzneimittel.

Dissertation, Universität München (1971)

ARORA, R.B., SHARMA, J.N., TARAK, T.K., SAXENA, Y.R.

The binding of quinidine to myocardial cellular components.

J. Pharm. Pharmacol. 15, 151 (1963)

BATE-SMITH, E.C.

Buffering of muscle in rigor .

J. Physiol. 92, 336 - 343 (1938)

BERTI, T., FERRARI, M.

Rapporti struttura-azione nei derivati fenotiazinici.

Atti dell' Istituto Veneto di scienze, lettere

ed arti 117, 173 - 180 (1958)

BEYER, K.H., SADEE, W.

Spektrophotometrische Bestimmung von 5-Phenyl-1,4-benzodiazepin-Derivaten und Untersuchungen über den Metabolismus des Nitrazepams.

Arzneimittel-Forsch. 19, 1929 - 1931 (1969)

BIRD, A.E., MARSHALL, A.C.

Correlation of serum binding of penicillins with partition coefficients.

Biochem. Pharmacol. 16, 2275 - 2290 (1967)

BITTAR, E.E.

Cell p_H .

Butterworths, London (1964)

BORGA, O., AZARNOFF, D.L., FORSHELL, G.P., SJÖQVIST, F.
Plasma protein binding of tricyclic antide -
pressants in man.
Biochem. Pharmacol. 18, 2135 - 2143 (1969)

BOYLE, P.J., CONWAY, E.J.
Potassium accumulation in muscle and associated changes.
J. Physiol. 100, 1 - 63 (1941)

BRATTON, A.C., MARSHALL, E.K.
A new coupling component for sulfanilamid determination.
J. biol. Chem., 128, 537 - 550 (1939)

BRODIE, B.B.
Distribution and fate of drugs .
In: Absorption and distribution of drugs T.B.Binns ed.
Livingstone, Edinburg u. London (1964)

BRODIE, B.B.
Pharmacological and clinical implications of drug transport.
In: Transport function of plasma proteins, ed.
P. Desgrez u. P.M. Traverse Elsevier, Amsterdam (1966)

BRODIE, B.B., AXELROD, J.
The fate of aminopyrine (Pyramidon) in man and methods for the
estimation of aminopyrine and its metabolites in biological
material.
J. Pharmacol. 99, 171 - 184 (1950)

BRODIE, B.B., MARK, L.C., PAPPER, E.M., LIEF, P.A., BERNSTEIN, E.
ROVENSTINE, E.A.
The fate of thiopental in man and a method for its estimation in
biological material.
J. Pharmacol. 98, 85 - 96 (1950)

v.BRUCK, C.G., KUHNE, J.

Zur Bestimmung der Eiweißbindung von Sulfonamiden mittels der Ultrafiltermethode.

Arzneimittel-Forsch. 12, 1116 - 1119 (1962)

BÜCH, H., KNABE, J., BUZELLO, W., RUMMEL, W.

Stereospecificity of anesthetic activity, distribution, inactivation and protein binding of the optical antipodes of two N-methylated barbiturates.

J. Pharmacol. 175, 709 - 716 (1970)

BURNS, J.J., ROSE, R.K., CHENKIN, T., GOLLMAN, A., SCHUBERT, A., BRODIE, B.B.

The physiological disposition of phenylbutazone in man and a method for its estimation in biological material.

J.Pharmacol. 109, 346 - 357 (1953)

CHIGNELL, C.F.

Physical methods for studying drug protein binding.

In: Hdb. d. exp. Pharmakologie XXVIII/1, S. 187 - 212 (1971)

Springer-V., Berlin, Heidelberg, New York

COLLANDER, R.

The partition of organic compounds between higher alcohols and water.

Acta Chem. Scand. 5, 774 - 780 (1951)

CRAIG, L.C., ANSEVIN, A.

Dialysis studies VI; experiments with amino acids.

Biochemistry 2, 1268 - 1271 (1963)

CRAIG, L.C., KING, T.P.

Dialysis.

In: Methods of biochemical analysis, VolX, ed. D. Glick
Interscience Publ., New York, London, Sydney (1966)

CURRY, S.H.

Plasma protein binding of chlorpromazine.

J. Pharm. Pharmacol. 22, 193 - 197 (1970a)

CURRY, S.H.

Theoretical changes in drug distribution resulting from changes in binding to plasma proteins and to tissues.

J. Pharm. Pharmacol. 22, 753 - 757 (1970b)

DETTLI, L.

Der Konzentrationsbegriff in der Chemotherapie mit Sulfanilamiden.

Arzneimittel-Forsch. 11, 861 - 866 (1961)

DINGELL, J.V., SULSER, F., GILLETTE, J.R.

Species differences in the metabolism of imipramine and desmethylimipramine.

J. Pharmacol. 143, 14 - 22 (1964)

DYDYNKA, M., WILKIE, D.R.

The osmotic properties of striated muscle fibers in hypertonic solutions.

J. Physiol. 169, 312 - 329 (1963)

EHRENPREIS, S.

Drug-macromolecular interactions.

Fortschritte Arzneimittelforsch. 14, 59 - 138 (1970)

FELTKAMP, H.

Das Verteilungsverhalten von Barbitursäurederivaten.

Arzneimittel-Forsch. 15, 238 - 242 (1965)

FILATOVA, L.G., SHTRANKFELD, I.G.

Interaction between the dye congo-red and the contractile protein of muscle.

Biofizika 13, 899 - 902 (1968) Nach Chemical Abstracts 70, 37374 K (1969)

FIREMARK, H., BARLOW, C.F., ROTH, L.J.

The entry, accumulation and binding of diphenylhydantoin-2-C¹⁴ in brain.

Int. J. Neuropharmacol. 2, 25 - 38 (1963)

FLEXNER, L.B.

A thermodynamic analysis of ultrafiltration.

J. Biol. Chem. 121, 615 - 630 (1937)

FRIEMEL, G.

Die Bindung von Arzneimitteln an die Plasmaproteine verschiedener Tierarten.

Dissertation, Universität München (1968)

GANSORN, A., KURZ, H.

Unterschiede zwischen der Proteinbindung Neugeborener und Erwachsener und ihre Bedeutung für die pharmakologische Wirkung.

Arch. Pharmak. 260, 117 - 118 (1968)

GARN, F.W., KIMBEL, K.H.

Verbleib und Ausscheidung von Depot - Sulfonamiden.

Arzneimittel-Forsch. 11, 701 - 707 (1961)

GENAZZANI, E., SANTAMARIA, R.

Interaction of cardiac glycosides with serum albumin and contractile proteins.

Pharmacol. Res. Commun. 1, 249 - 257 (1969)

GIGON, P.L., NAYAK, P.K., SCHANKER, L.S.

Transport and binding of chloroguanide-triazine by rat liver slices.

Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 132, 1103 - 1109 (1969)

GILLETTE, J.R.

Reversible binding as a complication in relating the in vitro effect of drugs to their in vivo activity.

Proc. 2nd Int. Pharmacol. Meeting 4, 9 - 21 (1963)

GLASSER, H., KRIEDELSTEIN, J.

Die Eiweißbindung einiger Psychopharmaka mit trizyklischem Ringsystem in Abhängigkeit von ihrer chemischen Konstitution. Arch. Pharmak. 265, 321 - 334 (1970)

GOLDBAUM, L.R.

An ultraviolet spectrophotometric procedure for the determination of barbiturates.

J. Pharmacol. 94, 68 - 75 (1948)

GOLDBAUM, L.R., SMITH, P.K.

The interaction of barbiturates with serum albumin and its possible relation to their disposition and pharmacological actions.

J. Pharmacol. 111, 197 - 209 (1954)

GOLDSTEIN, A.

The interactions of drugs and plasma proteins.

Pharmacol. Rev. 1, 102 - 165 (1949)

GREENBERG, D.M., GREENBERG, M.M.

Ultrafiltration: II bound water of biological colloids.

J. Gen. Physiol. 16, 559 - 569 (1933)

HESS, R., TESCHEMACHER, H.J., HERZ, A.

Über die Permeation von Xanthinderivaten in Gehirn und Liquor in Abhängigkeit von Lipidlöslichkeit, Gewebsbindung und Stoffwechsel.

Arch. Pharmak. 261, 469 - 485 (1968)

HILL, A.V.

The state of water in muscle and blood and the osmotic behaviour of muscle.

Proc. Roy. Soc. B 106, 447 - 505 (1930).

HILZENBECHER, Ch.

Die Bindung von Pharmaka an Humanhämoglobin.

Dissertation, Universität München (1972)

INGRAHAM, R.C., LOMBARD, C., VISSLER, H.B.

The characteristics of ultrafiltrates of plasma.

J. Gen. Physiol. 16, 637 - 655 (1933)

v.JAGOW, R., KAMPEFFMEYER, H., KIESE, M.

The preparation of microsomes.

Arch. Pharmak. 251, 73 - 87 (1965)

KAUZMANN, W.

Some factors in the interpretation of protein denaturation.

Advanc. Prot. Chem. 14, 1 - 63 (1959)

KEEN, P.M.

The binding of three penicillins in the plasma of several species as studied by ultrafiltration at body temperature.

Brit. J. Pharmacol. 25, 507 - 514 (1965)

KEEN, P.M.

The binding of penicillins to bovine serum albumin.

Biochem. Pharmacol. 15, 447 - 463 (1966)

KEEN, P.

Effect of binding to plasma proteins on the distribution, activity and elimination of drugs.

In: Hdb. exp. Pharmacol. XXVIII/1 Kap. 10, 213 - 233 (1971)

Springer-V., Berlin, Heidelberg, New York

KIEHS, K., HANSCH, C., MOORE, L.

The role of hydrophobic bonding in the binding of organic compounds by bovine hemoglobin.

Biochemistry 5, 2602 - 2605, (1966)

KLAGES, F.

Lehrbuch der organischen Chemie.

de Gruyter, Berlin (1962)

KRIEGELSTEIN, J.

Zur Plasmaproteinbindung von Arzneimitteln.

Klin. Wochenschr. 47, 1125 - 1130 (1969)

KRIEDELSTEIN, J., KUSCHINSKY,
Über die Wechselwirkung von Phenothiazinderivaten
mit Rinderserumalbumin.

Arch. Pharmak. 262, 1 - 16 (1969)

KRÜGER-THIEMER, E., DILLER, W., DETTLI, L., BÜNGER, P.,
SEYDEL, J.,

Demonstration des Einflusses der Eiweißbindung und der
Ionisation auf die Pharmakokinetik am kombinierten gaskinetischen
Modell nach van t'Hoff und Langmuir.

Antibiot. et Chemother. 12, 171 - 193 (1964)

KRÜGER-THIEMER, E.

Die Anwendung programmgesteuerter Ziffernrechenautomaten für
die Lösung spezieller chemotherapeutischer Probleme.

Antibiot. et Chemother. 12, 253 - 269 (1964)

KUNIN, C.M.

Clinical Pharmacology of the new penicillins I.

Clin. Pharmacol. Ther. 7, 166 - 179 (1966a)

KUNIN, C.M.

Clinical Pharmacology of the new penicillins II.

Clin. Pharmacol. Ther. 7, 180 - 188 (1966b)

KUNTZMAN, R., TSAI, I., BURNS, J.J.

Importance of tissue and plasma binding in determining the
retention of norchlorcyclizine and norcyclizine in man, dog, and

J. Pharmacol. 158, 332 - 339 (1967)

KURZ, H.

Einfluß der physikalisch-chemischen Eigenschaften von
Kurznarkotika auf den "hang over".

Arch. Pharmak. 255, 33 (1966)

KURZ, H., TRUNK, H.

Some interfering factors in determining the protein-bound fraction
of chemotherapeutics.

Vortrag V. Internationaler Kongress für Chemotherapie, Wien (1968)

KURZ, H.

Die Bedeutung der Lipoidlöslichkeit in der Pharmakologie.
Präp. Pharmazie 6, 1 - 12 (1970)

LEO, A., HANSCH, C., ELKINS, D.

Partition coefficients and their uses.
Chemical reviews 71, 525 - 616 (1971)

LEVINE, R.J.C., TELLER, D.N., DENBER, H.C.B.

Binding of chlorpromazine and thioproperazine in vitro.
Mol. Pharmacol. 4, 435 - 444 (1968)

MARTIN, B.K.

Potential effect of the plasma proteins on drug distribution.
Nature 207, 275 - 276 (1967)

MEYER, M.C., GUTMAN, D.E.

The binding of drugs by plasma proteins.
J. Pharm. Sci. 57, 895 - 918 (1968)

MURTHY, K.S., ZOGRIFI, G.

Oil-water partitioning of chlorpromazine and other phenothiazine derivatives using dodecane and n-octanol.
J. Pharm. Sci. 59, 1281 - 1285 (1970)

NEMETHY, G.

Hydrophobe Wechselwirkungen.
Angew. Chemie 79, 260 - 271 (1967)

NIELSEN, T., COTMAN, C.

The binding of diphenylhydantoin to brain and subcellular fractions.
Europ. J. Pharmacol. 14, 344 - 350 (1971)

PAUL, M.F., PAUL, H.E., BENDER, R.C., KOPKO, F., HARRINGTON, C.M.
ELLIS, V.R., BUZARD, J.A.

Studies on the distribution and excretion of certain nitrofuranes.
Antibiot. and Chemother. 10, 287 - 302 (1960)

RAAFLAUB, J.

Über die Beziehungen zwischen der Lipoidlöslichkeit von Pharmaka und ihrem pharmakokinetischen Verhalten.

Experientia 26, 457 - 467 (1970)

REICHEL, H.

Muskelphysiologie.

Springer-V., Berlin, Göttingen, Heidelberg, (1960)

REIN, H., SCHNEIDER, M.

Einführung in die Physiologie des Menschen.

16 A., S. 273, Springer-V. Berlin, Göttingen, Hiedelberg (1971)

RENKIN, E.M.

Filtration, diffusion, and molecular sieving through porous cellulose membranes.

J. Gen. Physiol. 38, 225 - 243 (1955)

RIEDER, J.

Physikalisch-chemische und biologische Untersuchungen an Sulfonamiden.

Arzneimittel-Forsch. 13, 81 - 88 (1963)

ROLINSON, G.N., SUTHERLAND, R.

The binding of antibiotics to serum protein.

Brit. J. Pharmacol. 25, 638 - 650 (1965)

ROSENTHAL, H.E.

A graphic method for the determination and presentation of binding parameters in a complex system.

Analyt. Biochem. 20, 525 - 537 (1967)

SALZMANN, P.N., BRODIE, B.B.

Physiological disposition and fate of chlorpromazine and a method for its estimation in biological material.

J. Pharmacol. 118, 46 - 54 (1956)

SANDELL, K.B.

Über die Verteilung organischer Verbindungen zwischen Wasser und organischen Lösungsmitteln.

Monatshefte f. Chemie 89, 36 - 52 (1958)

SCHACH v. WITTENAU, M., YEARY, R.

The excretion and distribution in body fluids of tetracyclines after intravenous administration to dogs.

J. Pharmacol. 140, 258 - 266 (1963)

SCHACH v. WITTENAU, M., DELAHUNT, C.S.

The distribution of tetracyclines in tissues of dogs after repeated oral administration.

J. Pharmacol. 152, 164 - 169 (1966)

SCHANKER, L.S., MORRISON, A.S.

Physiological disposition of guanethidine in the rat and its uptake by heart slices.

Int. J. Neuropharmacol. 4, 27 - 39 (1966)

SCHOLTAN, W.

Die Bindung der Langzeitsulfonamide an die Eiweißkörper des Serums
Arzneimittel-Forsch. 11, 707 - 720 (1961)

SCHOLTAN, W.

Die Bindung der Sulfonamide an Eiweißkörper.

Arzneimittel-Forsch. 14, 469 - 473 (1964)

SCHOLTAN, W.

Die hydrophobe Bindung der Pharmaka an Humanalbumin und Ribonucleinsäure.

Arzneimittel-Forsch 18, 505 - 517 (1968)

SCHOLTAN, W., SCHMIDT, J.

Die Bindung der Penicilline an die Eiweißkörper des Serums und Gewebes.

Arzneimittel-Forsch. 12, 741 - 750 (1962)

SEYDEL, J.

Molekulare Grundlagen der Sulfonamidwirkung.

Arzneimittel-Forsch. 16, 1447 - 1453

SPRING, P.

Die Bindung einiger Sulfanilamide an die Bluteiweißkörper des Menschen.

Arzneimittel-Forsch 16, 346 - 354 (1966)

SUNDERMANN, F.W.

The osmotic behaviour of water of blood serum .

J. Biol. Chem. 96, 271 - 283 (1932)

TEORELL, T.

Transport processes and electrical phenomena in ionic membranes

Progr.Biophys. Biophysical Chem. 3, 305 - 369 (1953)

THORP, J.M.

The influence of plasma proteins on the action of drugs.

In: ed. T.B. Binns Absorption and distribution of drugs,
S. 64 - 76 (1964), Livingstone Ltd., Edinburgh u. London

WADDELL, W.J., BATES, R.G.

Intracellular p_H

Physiol. Rev. 49, 285 - 329 (1969)

WILLBRANDT, W.

Membrane structure and selective permeability.

J. Gen. Physiol. 18, 933 (1935)

WILSON, C.W.M., BRODIE, B.B.

The absence of blood brain barrier from certain areas of the central nervous system.

J. Pharmacol. 133, 332 - 334 (1961)

WISEMAN, E.H., NELSON, E.

Correlation of in vivo metabolism rate and physical properties of sulfonamides.

J. Pharm. Sci. 53, 992 (1964)

WITZGALL, H., BOYENS, H.

Die Bedeutung der Bindung an Albumin, Körperzellen und
Bakterien für Pharmakodynamik und Wirkung von Arzneistoffen.
Arch. Int. Pharmacodyn. 148, 511 - 535 (1964)

WOODS, L.A., COCHIN, J., FORNFELD, E.G., SEEVERS, M.H.

Estimation of morphine in biological materials.

J. Pharmacol. 111, 64 - 73 (1954)

L e b e n s l a u f

Am 21. September 1944 wurde ich als Sohn des Majors Hermann Fichtl und seiner Ehefrau Eva, geb. Schönfeldt, in Rauschen (Ostpreußen) geboren.

Meine Kindheit verbrachte ich in Lenggriess, Rosenheim und München. Nach vierjährigem Volksschulbesuch trat ich 1954 in das Maximiliansgymnasium in München ein. Dort legte ich 1963 die Reifeprüfung ab.

Im Wintersemester 1963/64 immatrikulierte ich mich an der Universität München für die Fächer Mathematik und Physik. Nach zwei Semestern wechselte ich zur medizinischen Fakultät über.

Im Jahre 1967 legte ich die ärztliche Vorprüfung ab. Im Dezember 1970 bestand ich das medizinische Staatsexamen.

Anschließend war ich bis Juni 1971 an der IV. medizinischen Abteilung des Krankenhauses Schwabing als Medizinalassistent. Danach arbeitete ich bis Ende 1971 am Pharmakologischen Institut an der Fertigstellung meiner Dissertationsarbeit.

1972 war ich als Medizinalassistent fünf Monate an einer chirurgischen Privatklinik tätig und anschließend in der dermatologischen Universitätsklinik. Von Dezember 1972 bis Juli 1973 war ich bei der Bundeswehr.

Seit Oktober 1973 bin ich als Assistent am Pharmakologischen Institut der Universität München tätig.

